

بررسی تنوع ژنتیکی شترهای دوکوهانه ایران

سعید شاه‌کرمی^۱، فضل‌ا. افراز^۲، سید ضیاءالدین میرحسینی^{۳*}، محمد حسین بنابازی^۴، نادر اسدزاده^۵، نعمت‌ا. اسدی^۶، بهزاد همتی^۷، اباذر قنبری^۸، کمال رضوی^۹
۱ و ۷- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج،

۲، ۴، ۵، ۶ و ۹- به ترتیب استادیار، مربیان، کارشناس ارشد و کارشناس پژوهش

موسسه تحقیقات علوم دامی کرج

۳- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه گیلان

۸- کارشناس ارشد مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mirhosin@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۱۱- تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳)

چکیده

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،

شتر دوکوهانه،

نشانه‌های ریزماهواره،

DNA

GenAlEx 6.3

نژادهای دام و طیور بومی در هر کشور به عنوان سرمایه ملی و محصول کلیدی مطرح هستند و حفظ و تکثیر این نژادها از ارزش و اهمیت زیادی برخوردار است. جمعیت شترهای دو کوهانه (*Camelus bactrianus*) کشور به عنوان یکی از نژادهای با ارزش دامی در دهه‌های اخیر به شدت کاهش یافته، در حالیکه هیچگونه اطلاعاتی در مورد تنوع ژنتیک این دام وجود ندارد. در این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیک جمعیت مذکور، ۱۱۰ نفر شتر دو کوهانه با استفاده از هفت جفت آغازگر ریزماهواره‌ای (VOLP03، VOLP67، YWLL08، LCA63، LCA77، LCA56 و LCA33) مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش استخراج نمکی تغییر یافته بهینه شده انجام شد. واکنش‌های PCR با تمام نشانگرها بخوبی انجام شد. تمامی جایگاه‌ها در جمعیت مذکور، بجز جایگاه LCA77 که یک‌شکل بود، از چندشکلی مناسب برخوردار بودند. در کل جمعیت تمامی مکان‌های ژنی مورد مطالعه از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف معنی‌داری نشان دادند ($P < 0.001$). تنوع ژنتیک، با معیارهای میانگین آلل‌های موثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) بیان شد که به ترتیب، 0.534 ± 0.622 ، 0.184 ± 0.714 ، 0.114 ± 0.489 و 0.237 ± 0.557 برآورد شدند. بیشترین (0.771) و کمترین (0.165) میزان هتروزیگوسیتی و بیشترین (0.742) و کمترین (0.151) ارزش PIC در بین جایگاه‌های چندشکل به ترتیب مربوط به جایگاه‌های VOLP67 و LCA33 بود. نتایج نشان داد که جایگاه‌های مورد مطالعه از چندشکلی مناسبی در جمعیت مورد مطالعه برخوردار هستند و علاوه بر این تنوع ژنی در شتر دو کوهانه ایران نشان می‌دهد علیرغم اندازه بسیار کم جمعیت، این گونه همچنان از تنوع ژنتیک قابل قبولی برخوردار است، که می‌تواند به حفظ آن کمک شایانی نماید. با این وجود، برای تعیین دقیق تر ساختار ژنتیکی این جمعیت لازم است تعداد بیشتری از جایگاه‌های ریزماهواره بررسی شوند.

مقدمه

اهلی سازی حیوانات از گام‌های اساسی در توسعه جمعیتی و فرهنگی بشر بود که به همراه اهلی شدن گونه‌های مختلف گیاهی بنیان کشاورزی امروزه گذاشته شد (Diamond 2002). در طول تاریخ فشارهای اصلی تکاملی یعنی جهش، انتخاب روش‌های پرورش، سازش‌پذیری، جدا شدن و رانش ژنتیکی موجب پیدایش تنوع بسیار شدید در بین جمعیت‌های محلی دام و طیور شده است. این فرآیند در طی قرون گذشته، تشکیل نژادهای شناخته شده با سطوح عملکردی مختلف را که کاربردهای گوناگون داشتند موجب شده است. در طول بهبود ژنتیکی دهه‌های گذشته، پیشرفت و تمرکز زیاد روی برنامه‌های موثرتر انتخاب، موجب شتاب بخشیدن در تعدادی از نژادها شد. تلقیح مصنوعی و انتقال جنین پخش مواد ژنتیکی را تسهیل نمود. علاوه بر این پیشرفت در تکنولوژی تغذیه دام و طیور موجبات تغذیه بهینه را فراهم آورد. همچنین پیشرفت در سیستم‌های حمل و نقل و مکانیزه شدن آن نه تنها منجر به یکنواختی و کنترل جدی محیط‌های پرورشی شد بلکه توجه به دام‌های مورد استفاده در سیستم حمل و نقل یعنی اسب و شتر و... به شدت کاهش یافت. نتیجه همه این پیشرفت‌ها در جنبه‌های گوناگون، جایگزینی نژادهای پر تولید به جای نژادهای بومی و حذف تقریباً کامل دام از سیستم حمل و نقل در سراسر جهان بود. این پیشرفت‌ها نگرانی‌های روزافزونی را در خصوص فرسایش منابع ژنتیکی پدید آورده است (FAO 2007). با توجه به اینکه احتمال استفاده از تنوع ژنتیکی نژادهای کم تولید در برنامه‌های اصلاح نژادی حال و آینده وجود دارد (Bruford et al. 2003; Stevens 1989) لذا حفاظت از آنها مخصوصاً برای استفاده در برنامه‌های اصلاح نژادی آینده ضرورت دارد. بر اساس گزارش‌های FAO، ۲۰ درصد از کل ۷۶۰۰ نژاد گزارش شده در جهان که به ۱۸ گونه از پستانداران و ۱۶ گونه از پرندگان تعلق دارند در معرض خطر هستند و ۶۲ نژاد در طول ۶ سال اول این قرن منقرض شده‌اند (FAO 2007).

مدیریت موثر منابع ژنتیکی دام و طیور مستلزم داشتن اطلاعات جامع در خصوص ویژگی‌های نژادی، شامل اطلاعات مربوط به اندازه و ساختار جمعیت، پراکنش جغرافیایی، محیط پرورش و تنوع ژنتیکی بین و داخل نژادها است.

با توجه به اینکه شفاف‌سازی تنوع ژنتیک ارتباط مستقیم با استفاده پایدار از منابع ژنتیک حیوانات دارد، نیاز به اطلاعات وسیع مولکولی تنوع ژنتیکی داخل و بین نژاد برای مدیریت موثر منابع ژنتیکی دام و طیور مورد پذیرش اکثر پژوهشگران است (Stevens 1989; Sanguinetti et al. 1994; Hall and Bradley 1995; Barker JSF 1999; Bruford et al. 2003; Nolte et al. 2005; Toro and Caballero 2005; Toro et al. 2009). شامل ۴ گونه اهلی است که به ۳ جنس تعلق دارد. یکی از این گونه‌ها شتر دوکوهانه (*Camelus bactrianus*) می باشد که زوج سم بوده و دو کوهان در پشت دارد و به دو حالت اهلی و وحشی (*Camelus bactrianus ferus*) زیست می‌نماید. نوع اهلی این گونه بومی در مناطق استپی کشورهای آسیای مرکزی یعنی افغانستان، هند، قزاقستان، قرقیزستان و پاکستان پراکنده می‌باشد بطوریکه در بعضی از مناطق این کشورها با شترهای تک کوهانه به صورت مشترک وجود دارد. علاوه بر این در قسمت‌های جنوب روسیه، بخش‌های غربی چین و مغولستان نیز پراکنده است (Jianlin 2000).

بطور کلی تحقیقات نشانگرهای مولکولی در خانواده اشتراک مخصوصاً در جنس کاملوس و بطور خاص در گونه دو کوهانه بسیار اندک است لذا توسعه نشانگرهای ریزماهواره در شتر مورد بررسی قرار گرفته است (Jianlin 2005). در این گزارش امکان استفاده مشترک از بسیاری از نشانگرهای ریزماهواره در کلیه شترهای جهان قدیم و جدید، شترهای وحشی و تک کوهانه و دوکوهانه از جنبه‌های تکاملی و تعیین استراتژی‌های لازم جهت حفاظت از گونه‌های در حال انقراض مورد تایید قرار گرفته است. کار گروه ISAG/FAO در فهرست نشانگرهای ملکولی اخیر خود، بیست و پنج نشانگر ریزماهواره را برای بررسی ملکولی شترهای جهان قدیم و جدید پیشنهاد نموده است (Lewontin 1974; Hoffmann et al. 2004). این نشانگرها تاکنون فقط در بررسی‌های منطقه‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

به منظور بررسی رابطه تکاملی بین شترهای وحشی باقیمانده در چین و مغولستان و شترهای دوکوهانه اهلی و همچنین شناسایی منشا این شترها توالی ژن *cytb* میتوکندریایی توسط Ji et al. (2009) تعیین شد. نتایج نشان داد این شترهای وحشی باقیمانده گروهی مستقلی از شترهای اهلی بوده نمی‌تواند اجداد

ای در بدست آوردن عناصر مورد نیاز برای حمایت از برنامه‌های حفاظت نژادی دارد، برای بهبود برنامه‌های اصلاح نژادی نیز نقش مشابه را ایفا می‌نماید. همانطور که پیشتر اشاره شد تحقیق در خصوص تنوع ژنتیک دام می‌تواند با نشانگرهای بسیار چندشکل همانند ریزماهواره با دو ویژگی همباز بودن و طبیعت پراآلی انجام بگیرد. این تحقیق به منظور تعیین ساختار و تنوع ژنتیکی شترهای دوکوهانه ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره اجرا شد.

مواد و روش‌ها

دام، خون‌گیری و استخراج DNA در مطالعه حاضر، از سیاهرگ و داج ۱۱۰ نفر از شترهای دوکوهانه شترداران نقاط مختلف استان اردبیل (دشت مغان) و ایستگاه‌های جعفرآباد و جهادآباد با استفاده از لوله خلا دار ۵ میلی لیتری حاوی ماده ضد انعقاد EDTA خون‌گیری شد. نمونه‌های خون کامل در ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور منتقل و در فاصله زمانی کوتاه تا استخراج DNA (چند روز تا دو هفته)، نمونه‌ها در 4°C نگهداری شدند. استخراج DNA به روش بهینه شده و تغییر یافته استخراج نمکی (Miller et al. 1988) انجام شد. البته با توجه به مشکلاتی که در روش اصلی استخراج نمکی وجود داشت، تغییراتی در آن داده شد. این تغییرات شامل استفاده از: یک بافر جدا کننده برای رسوب دادن گلبولهای سفید بجای جداسازی لایه نازک حاوی گلبولهای سفید، که کاری بسیار دشوار و ظریف می‌باشد؛ کلروفرم به منظور جلوگیری از مخلوط شدن فاز حاوی DNA با رسوبات تشکیل شده به هنگام جداسازی فازها و حذف هر گونه آلودگی از قبیل پروتیین و نمک‌های اضافی؛ محلول استات سدیم جهت متراکم تر نمودن کلاف DNA در مرحله جمع‌آوری رشته‌های DNA به کمک میله شیشه‌ای بودند. DNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین کمیت شده و برخی از نمونه‌ها جهت تعیین کیفیت، بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند.

مستقیم دوکوهانه‌های اهلی باشند. علاوه بر این شترهای دوکوهانه تک اجدادی هستند و از یک جمعیت وحشی بوجود آمده‌اند. در تحقیقی که ۱۹ نشانگر ریزماهواره در شترهای جهان قدیم و جدید مورد استفاده قرار گرفت، کمترین و بیشترین تعداد آلل، میزان هتروزاگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده برای نشانگرهای بررسی شده در شترهای دوکوهانه قدیم به ترتیب (۱ و ۱۴)، (صفر و ۰/۸۷) و (صفر و ۰/۹۰) بود (Jianlin et al. 2000). با بررسی ۱۲ نشانگر ریزماهواره در ۱۴۰ نفر شتر مربوط به ۴ جمعیت چین و ۲ جمعیت مغولستان ۸۰ آلل مختلف مشاهده شد که تعداد آلل هر لوکوس بین ۱۴-۳ متغیر بود. متوسط هتروزاگوسیتی مشاهده شده در چهار جمعیت چینی به ترتیب ۰/۴۹۴، ۰/۵۲۶، ۰/۵۴۱ و ۰/۵۹۵ برآورد شد، در حالیکه این پارامتر در دو جمعیت مغولستان به ترتیب ۰/۴۵۳ و ۰/۵۲۱ نشان داده شد. علاوه بر این نتایج نشان داد شترهای اهلی دوکوهانه چین و مغولستان از نقطه نظر برنامه‌های حفاظتی و اصلاح نژادی باید دو جمعیت کاملاً مجزا و جداگانه در نظر گرفته شوند (Jianlin et al. 2004).

شتر دوکوهانه ایران با توجه به جنه بسیار درشت و گوشتواری و تولید نتاج مطلوب از نظر تولید گوشت و بعضی صفات تولیدی دیگر در آمیخته‌گری با شترهای ماده تک‌کوهانه و یگانه وسیله حمل و نقل در کوچ عشایر از دشت مغان تا دامنه‌های سبلان، نقشی اساسی در زندگی این عشایر داشت و خاص این منطقه محسوب می‌شد. از اینرو مورد توجه و اقبال بود و از جمعیت مطلوب برخوردار بود. امروزه با ورود وسائط نقلیه موتوری در زندگی عشایر منطقه جمعیت آن به شدت کاهش یافت بطوریکه کل جمعیت حدود ۱۳۰ نفر تخمین زده می‌شود.

شناسایی خصوصیات فنوتیپی و ژنتیکی بخشی از برنامه‌های حفاظت است. در همین راستا تخمین تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی برای مدیریت منابع ژنتیکی برای استفاده پایدار و حفاظت از آنها مهم می‌باشد. این موضوع وقتی که گونه‌های دام و طیور، مثل شتر در دهه‌های گذشته به شدت رو به کاهش نهادند، از اهمیت بیشتری برخوردار می‌شود.

شناسایی ویژگی‌های نژادی اولین اقدام در هر برنامه حفاظتی می‌باشد. ارزیابی ساختار ژنتیک جمعیتی علاوه بر اینکه سهم عمده-

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای ریز ماهواره مورد استفاده در آزمایش

شماره دسترسی*	اندازه (جفت باز)	توالی	آغازگر
AF305228	۱۴۸-۱۶۸	AGACGGTTGGGAAGGTGGTA CGACAGCAAGGCACAGGA	VOLP03
AF305237	۱۵۷-۱۸۵	TTAGAGGGTCTATCCAGTTTC TGGACCTAAAAGAGTGGAG	VOLP67
non	۱۳۲-۱۵۸	ATCAAGTTTGAGGTGCTTTCC CCATGGCATTGTGTTGAAGAC	YWLL08
AF060103	۱۳۶-۱۶۴	GAGCACAGGGAAGGATATTCA ACAGCAAAGTGATTCCATAATACA	LCA33
AF091122	۱۳۴-۱۳۸	ATGGTGTTCACAGGCGTTG GCATTACTGAAAAGCCCAGG	LCA56
AF091123	۱۹۶-۲۲۰	TTACCCAGTCCTTCGTGGG GGAACCTCGTGGTTATGGAA	LCA63
AF091129	۲۳۳-۲۶۳	TGTTGACTAGAGCCTTTCTCTTT GGGCAAGAGAGACTGACTGG	LCA77

*کد دسترسی به ریزماهواره ها در بانک ژن NCBI با آدرس اینترنتی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/viewer.cgi> میباشد

سازی بر این اساس انجام شد. دمای ذوب بطور معمول از طریق فرمول ساده زیر نیز محاسبه شد:

$$T_m = [4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)]$$

۲۰ نوکلئوتیدی

جدول ۲- غلظت اجزا مختلف واکنش زنجیره ای پلیمرز در تکثیر نمونه های DNA شتر

غلظت نهایی	اجزای واکنش
۱X	بافر PCR
۰/۲۵ μM	هر یک از آغازگرها
۲۰۰ μM	dNTPs
۰/۵ unit/reaction	آنزیم تک پلیمرز
۱۰۰-۲۰۰ ng/reaction	DNA الگو
متغیر	dd H ₂ O
۱۵ μl	حجم نهایی واکنش

هفت جفت آغازگر ریزماهواره با بررسی مقالات و توصیه ISAG/FAO انتخاب (Hoffmann et al. 2004; Mburu et al. 2003; Nevo 1978) و از شرکت Metabion کشور آلمان بصورت لیوفیلیزه (غیر حساس به دما) تهیه و پس از حل کردن و رقیق ساختن طبق دستورالعمل مربوطه در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند (جدول ۱).

واکنش PCR

در این مطالعه از بافر PCR شرکت سیناژن ایران استفاده شد. DNA ژنومی که از نمونه های خون استخراج شده بود بعنوان الگو در واکنش های PCR مورد استفاده قرار گرفت. واکنش های PCR در دستگاه ترموسایکلر (Biometra) (TGradient) با بلوک ۹۶ تایی برای تیوب های PCR به حجم ۰/۲ ml استفاده شد (جدول ۲).

غلظت نهایی MgCl₂ برای هر یک از جایگاه های LCA33، LCA56، LCA63 و LCA77، ۱/۵ mM، برای VOLP67، ۲/۵ mM و برای VOLP03 و YWLL08، ۳/۵ mM بود. در مورد دمای اتصال از دمای ذوب هر جایگاه به عنوان مبنا، استفاده و بهینه

واینبرگ در هر مورد با استفاده از نرم افزار GenAlEx 6.3 برآورد شد. میانگین و انحراف معیار تعداد آلل واقعی و موثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و شاخص شانون محاسبه شدند. از آماره محتوای چند شکلی (PIC) برای تعیین میزان چند شکلی نیز استفاده شد. هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) برای یک جایگاه با فرمول زیر محاسبه شد:

$$H_o = \frac{\sum N_{ij}}{N}$$

که در آن N_{ij} ($i \neq j$) تعداد افراد هتروزیگوت و N تعداد کل افراد در جمعیت مورد مطالعه می باشد (Hedrick 1999). هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_E) برای یک جایگاه نیز از فرمول

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

زیر محاسبه شد: که در آن عبارت $\sum_{i=1}^n p_i^2$ نسبت مورد انتظار هموزیگوتها می باشد و p_i فراوانی i امین آلل در یک جایگاه معین می باشد (Hedrick 1999).

شاخص اطلاعات شانون با فرمول زیر تعیین شد (Lewontin

$$H' = -\sum_i p_i \ln p_i \quad (1974)$$

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Buchanan and Thue 1998):

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2 p_i^2 p_j^2$$

که در آن k تعداد آللها و p_i و p_j فراوانیهای جمعیتی i و j امین آلل می باشد.

نتایج و بحث

همانطور که پیشتر بیان شد تحقیقات نشانگرهای مولکولی در جنس کاملوس بسیار اندک می باشد. از اینرو در این مبحث تلاش می شود نتایج این تحقیق با نتایج گزارش شده در خصوص دیگر جنس ها و گونه ها مقایسه شوند. نتایج بارگذاری DNA حاصله بر روی ژل آگارز یک درصد، در شکل ۱ نشان داده شد. همانطور که در این شکل مشهود است کیفیت در حد مطلوب (باندهای کاملاً تیز و بدون کشیدگی) بود.

دمای اتصال بهینه برای آغازگرهای VOLP03، VOLP67، LCA33، LCA56، LCA63 و LCA77 بترتیب ۶۴، ۵۳، ۵۳، ۵۵، ۵۸ و ۵۷ درجه سانتی گراد بدست آمد (جدول ۳). جهت آشکار سازی تفاوت قطعات DNA، از الکتروفورز ژل پلی-آکرلامید ۸ درصد استفاده شد. فرآورده های PCR را به نسبت ۲/۵ به ۱ با بافر بارگیری مخلوط شده و حدود ۱۰ μl از این مخلوط در چاهک ها بارگذاری و با ۷۵ ولت ثابت (شدت جریان حدود ۱۰ میلی آمپر و توان ۰/۹ تا ۱ وات) به مدت ۱۸ ساعت الکتروفورز شدند. برای نمایان سازی باندها از روش سریع رنگ آمیزی نقره (Ruane 2000) استفاده شد.

جدول ۳- برنامه حرارتی مناسب برای آغازگرهای مورد مطالعه

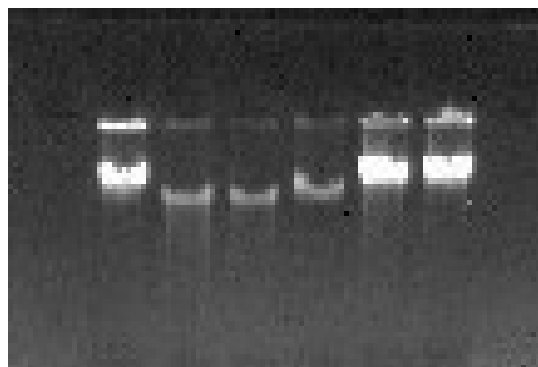
زمان (دقیقه)	درجه حرارت (°C)	مراحل PCR
۵	۹۵	واسرشته سازی ۱
۴۵ ثانیه	۹۴	واسرشته سازی ۲
۱	بر اساس آغازگرها	اتصال آغازگر ۳
۱	۷۲	بسط ۴
۱۵	۷۲	بسط نهایی ۵
-	۴	نگهداری ۶

مراحل دو تا چهار، ۳۰ بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل مشاهدات و داده ها

پس از تهیه عکس به کمک دستگاه Gel Documentation تصویر ژل ها در کامپیوتر ذخیره شده و سپس با استفاده از نرم افزارهای GELPRO و UVIDOC باندها تعیین اندازه و خوانده شدند. اندازه گیری ها به کمک باندهای حاصل از Ladder تجارتي #SM1323 شرکت Fermentas انجام شد و پس از آن بر اساس اندازه های حاصله و اطلاعات مربوط به هر نشانگر و البته در نظر گرفتن تصویر ژل و تعداد آلل های قابل تشخیص، تعداد آلل های مشاهده شده مربوط به هر نشانگر بدست آمد و بعد بر اساس تعداد باندهای طیف هر فرد، ژنوتیپ فرد مورد نظر تعیین شد، پس از آن با استفاده از نرم افزار GenAlEx 6.3 فراوانی ژنوتیپ ها و آلل ها محاسبه شدند.

در آزمون تعادل هاردی واینبرگ جمعیت مورد مطالعه از آزمون مربع کای استفاده شد. آماره و احتمال برقراری تعادل هاردی



شکل ۱- کیفیت DNA استخراج شده از نمونه های مورد بررسی

شترهای تک کوهانه و دوکوهانه به ترتیب ۵ و ۱۵ گزارش نمودند که با دو آلل مشاهده شده در این تحقیق هیچگونه هماهنگی ندارد. در حالیکه در گزارش مذکور تعداد آلل های VOLP67 و YWLL08 برای شترهای دوکوهانه به ترتیب ۱۱ و ۵ ذکر شده است که می توان گفت با تعداد ۸ و ۴ آلل مشاهده شده برای جایگاه های مزبور هماهنگی دارد. بطور کلی به نظر می رسد تثبیت آلل LCA77 و کاهش شدید آللی در بعضی از جایگاه ها در شتر دوکوهانه ایران (قابل زیست در یک منطقه محدود دشت مغان تا دامنه سبلان) مواجه با کاهش شدید جمعیتی دور از انتظار نمی باشد. بعنوان نتیجه گیری می توان گفت که از نظر تعداد آلل با آنچه که قبلا جهت تخمین تنوع ژنتیکی پیشنهاد شده بود، همخوانی دارد (Barker 1999).

دامنه اندازه آلل های مشاهده شده در این تحقیق برای جایگاه YWLL08 و جایگاه های LCA56، LCA63، LCA77 به ترتیب با نتایج تحقیقات (Lang et al. 1996)، (Spencer et al. 2010) تقریبا مطابقت دارد. دامنه اندازه آلل VOLP67 با دامنه گزارش شده برای برای دو گونه شتر تک کوهانه و دوکوهانه توسط Jianlin et al. (2000) تقریبا یکسان است. دامنه اندازه آلل دیگر جایگاه های مورد مطالعه در این پژوهش با نتایج منابع ذکر شده همخوانی ندارند. البته این عدم تطابق ها و ناهماهنگی ها در تطبیق گزارش های (Lang et al. 1996)، (Jianlin et al. 2000) و Spencer and Woolnough (2010) برای گونه های مختلف شتر حتی در یک گونه نیز مشهود است. بر اساس نتایج حاصله هیچ یک از جایگاه های مورد بررسی در

واکنشهای PCR با هر هفت جفت آغازگر بخوبی انجام شد. در سه جایگاه YWL08، VOLP67، LCA63، VOLP67، LCA63، YWL08 آلل های صفر دیده شدند. معیار چندشکلی بودن هر جایگاه در این پژوهش، این بود که وفور فراوان ترین آلل کمتر از ۰/۹۹ یا ۰/۹۵ باشد. در این بررسی تنها جایگاه LCA77، یک شکل مشاهده شد. دامنه اندازه آلل ها برای جایگاه های LCA33، LCA56، LCA63، LCA77، VOLP03، VOLP67، YWLL08 بترتیب ۱۰۵-۹۰، ۱۵۵-۱۳۰، ۲۴۰-۲۰۵، ۲۳۹، ۱۲۵-۱۲۰، ۱۹۵-۱۵۰ و ۱۶۰-۱۳۰ جفت باز بدست آمد که نامگذاری آلل ها نیز بر همین اساس انجام گرفت (جدول ۱). تعداد آلل های هر جایگاه، معیار مناسبی از تنوع ژنتیکی می باشد (Nevo 1978). همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده تعداد کل آلل در جمعیت ۲۵ آلل با ۴ آلل مشترک در جایگاه های مختلف با میانگین $3/571 \pm 0/896$ برای هر جایگاه است که در دامنه میانگین آللی گزارش شده شتران دو کوهانه چین و مغولستان (۳/۵۸-۴/۷۵) قرار دارد (Jianlin et al. 2004). دامنه تعداد آلل بین ۸-۱ متغیر می باشد که در مقایسه با شترهای تک کوهانه وحشی استرالیا که در اواسط قرن نوزدهم میلادی از افغانستان و پاکستان وارد این کشور شدند (Spencer and Woolnough 2010) از نظر تعداد آلل در جایگاه های LCA63 و VOLP67 با گزارش این پژوهشگران مطابقت دارد ولی در جایگاه های LCA56، VOLP03، YWLL08 آلل های مشاهده شده به مراتب کمتر از آلل های گزارش شده توسط پژوهشگران مذکور است و تفاوت آللی برای جایگاه LCA77 جزئی می باشد. همچنین Jianlin et al. (2000) تعداد آلل های VOLP03 را در

بررسی که Spencer et al. (2010) روی شتران تک کوهانه امارات متحده عربی، استرالیا و آفریقا انجام دادند، متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار را به ترتیب ۰/۵۳۱، ۰/۵۳۰ و ۰/۶۴۶ گزارش کردند. در تحقیق این پژوهشگران، متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای شتر دوکوهانه ۰/۵۴۳ برآورد شد. در دو تحقیق دیگر متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای شتران تک کوهانه استرالیا، کنیا، پاکستان، عربستان سعودی و امارات متحده عربی به ترتیب ۰/۵۴۴، ۰/۵۳۸، ۰/۵۹۳، ۰/۵۹۴ و ۰/۵۱۶ گزارش شده است (Mate' et al. 2005; Simianer 2005). متوسط پارامتر مذکور برای دو جمعیت شتر دوکوهانه مغولستان و چهار جمعیت چین به ترتیب ۰/۵۲۶، ۰/۵۴۵، ۰/۵۶۱، ۰/۵۴۷ و ۰/۵۷۷، و ۰/۶۰۲ محاسبه شد (Jianlin et al. 2004). همانطور که جدول ۵ نشان می‌دهد متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار محاسبه شده در جمعیت شتر دوکوهانه ایران ۰/۴۸۹ است که تقریباً در حد هتروزیگوسیتی‌های گزارش شده می‌باشد. نسبت چند شکلی (N_E)، معیار دیگری است که برای تعیین میزان چند شکلی جایگاه‌ها استفاده می‌شود که میزان آن در پژوهش حاضر ۲/۶۲۲ محاسبه شد (جدول ۵). این پارامتر در تحقیق Spencer et al. (2010) با ۱۸ نشانگر ریزماهواره (شامل ۷ نشانگر استفاده شده در تحقیق حاضر) روی شترهای تک کوهانه استرالیا، ۳/۴۴ برآورد شد که به نظر می‌رسد تک شکل شدن LCA77 در جمعیت دوکوهانه ایران عامل کاهش N_E در این شترها باشد. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) نیز از جمله معیارهای چند شکلی است که تحت تأثیر تعداد آلل در جایگاه مورد نظر و نیز فراوانی های آللی قرار دارد. نتایج حاصله در جدول ۵ خلاصه شده است. در میان همه جایگاه‌ها، بیشترین و کمترین ارزش PIC به ترتیب مربوط به جایگاه VOLP67 و ۰/۷۴۲ (و جایگاه LCA33 ۰/۱۵۱۸) می‌باشد. همچنین همانطور که انتظار می‌رود تمامی مقادیر PIC در مقایسه با مقادیر هتروزیگوسیتی متناظرشان کمتر می‌باشند. مقایسه ارزشهای PIC در سطح جمعیت‌ها به‌ازا تمامی جایگاه‌ها می‌تواند سطح تغییرپذیری را در داخل هر جمعیت در مقایسه با سایر جمعیت‌ها نشان دهد (Buchanan and Thue 1998).

تعداد هاردی-واینبرگ نبودند و انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی-واینبرگ نشان دادند ($p < 0.001$). با توجه به اینکه برای مطالعه حاضر از اکثر جمعیت موجود شتر دوکوهانه کشور (۱۱ نفر) نمونه گیری به عمل آمده است و تعداد جمعیت مذکور در حال حاضر بسیار کم می‌باشد، انتظار عدم تعادل هاردی واینبرگ به علت کوچک بودن اندازه جمعیت منطقی به نظر می‌رسد. نکته قابل توجه این بود که شتران دوکوهانه در جایگاه‌های LCA33 و LCA77 هموزایگوت و در بقیه جایگاه‌ها هتروزیگوت بودند (جدول ۲). تنوع ژنی بصورت هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) در هر جایگاه به همراه میانگین و انحراف معیار مربوطه در جدول ۴ ارائه شده است. دامنه H_o در بین همه جایگاه‌ها ۰-۱ می‌باشد چون که دو جایگاه LCA33 و LCA77 هموزایگوت بودند. دامنه H_e نیز از صفر (LCA77) تا ۰/۷۷۱ (VOLP67) بود. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جمعیت به ترتیب 0.184 ± 0.714 و 0.489 ± 0.114 بود. چون حد نهایی برای هتروزیگوسیتی‌ها یک است و از اینرو مقادیر هتروزیگوسیتی به افزایش تنوع زیاد حساس نمی‌باشند، مقایسه این مقادیر بعنوان معیار تنوع درون جمعیتی برای نشانگرهای بسیار چند شکل همچون ریزماهواره‌ها (که در اکثر موارد هتروزیگوسیتی حدود ۰/۸ یا بالاتر دارند) صحیح نبوده و این تفاوت‌های میان آنها اطلاعات دقیقی را بیان نمی‌کنند. بنابراین شاخص اطلاعات شانون (H') نیز برای همه جایگاه‌ها محاسبه و نتایج در جدول ۲ ارائه شده است. علیرغم آنکه تفسیر بیولوژیکی معیار H' مشخص نیست، ولی چون حداکثر مقدار H' برابر با $\ln(n)$ می‌باشد ممکن است برای اندازه‌گیری تنوع جایگاه‌های بسیار متغیر مفید باشد (Hedrick 1999). با این وجود نتایج مشابه با آنچه از هتروزیگوسیتی‌ها مشاهده شده بود (هم از لحاظ روند و هم از لحاظ بیشترین و کمترین مقدار) حاصل شد. بیشترین مقدار H' در بین جایگاه VOLP67 (۱/۷۲۰) می‌باشد که با توجه به تعداد آلل زیاد در این مورد (۸ آلل)، منطقی به نظر می‌رسد. کمترین مقدار نیز از آن جایگاه LCA77 (۰/۰۰۰) است که با توجه به اینکه شتران مورد مطالعه برای این جایگاه‌ها تنها یک آلل را دارند، قابل توجیه است. در

جدول ۴- فراوانی های آللی جایگاه های مورد مطالعه در جمعیت شتر دوکوهانه ایران

جایگاه	LCA33	LCA56	LCA63	LCA77	VOLP03	VOLP67	YWLL08
آلل							
۹۰	۰/۰۹۱	-	-	-	-	-	-
۱۰	۰/۹۰۹	-	-	-	-	-	-
۱۲۰	-	-	-	-	۰/۵۰۰	-	-
۱۲۵	-	-	-	-	۰/۵۰۰	-	-
۱۳۰	-	۰/۵۰۰	-	-	-	-	۰/۱۰۰
۱۴۰	-	-	-	-	-	-	۰/۲۷۴
۱۵۰	-	۰/۴۸۶	-	-	-	۰/۰۲۰	۰/۴۰۰
۱۵۵	-	۰/۰۱۴	-	-	-	-	-
۱۶۰	-	-	-	-	-	۰/۰۶۱	۰/۲۲۶
۱۷۰	-	-	-	-	-	۰/۰۹۷	-
۱۷۵	-	-	-	-	-	۰/۰۴۱	-
۱۸۰	-	-	-	-	-	۰/۳۶۲	-
۱۸۵	-	-	-	-	-	۰/۰۷۷	-
۱۹۰	-	-	-	-	-	۰/۲۶۲	-
۱۹۵	-	-	-	-	-	۰/۰۷۷	-
۲۰۵	-	-	۰/۲۰۸	-	-	-	-
۲۱۵	-	-	۰/۲۳۴	-	-	-	-
۲۲۵	-	-	۰/۲۰۸	-	-	-	-
۲۳۰	-	-	۰/۲۹۲	-	-	-	-
۲۳۹	-	-	-	۱/۰۰۰	-	-	-
۲۴۰	-	-	۰/۰۵۷	-	-	-	-

از این اطلاعات می توان چنین نتیجه گیری کرد که شاخص های چندشکلی جایگاه های مورد مطالعه نیز نشان داد که اگرچه این جایگاه ها از شتر تک کوهانه و شترهای دنیای جدید جدا گردیده اند، همچنان از چندشکلی مناسبی در جمعیت مورد مطالعه برخوردار هستند و می توان آنها را برای مطالعات بعدی بر روی شتر دوکوهانه توصیه نمود. علاوه براین تنوع ژنی در شتر دوکوهانه ایران نشان می دهد علیرغم اندازه بسیار کم جمعیت مورد مطالعه، این گونه همچنان از تنوع ژنتیکی قابل قبولی برخوردار است، که می تواند به حفظ آن کمک شایانی نماید. با این وجود، پیشنهاد می شود برای بررسی بهتر و دقیق تر از تعداد بیشتری جایگاه در تحقیقات بعدی استفاده شود تا تصویری از

تنوع موجود در درون این گونه با ارزش ایرانی بدست آید و بعنوان راهنمایی برای تصمیم گیریهای حفاظتی آتی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از موسسه تحقیقات علوم دامی به دلیل تامین اعتبارات و امکانات اجرایی تحقیق و از مسئولین ایستگاه های تحقیقات شتر دوکوهانه جهادآباد و جعفرآباد استان اردبیل و همچنین از شترداران آن منطقه که در تهیه نمونه های خون همکاری صمیمانه داشته اند ابراز می دارد.

جدول ۵- مقادیر تنوع ژنتیکی ۷ جایگاه ریزماهواره در ۱۱۰ شتر دو کوهانه ایران شامل تعداد آل موثر (N_E)، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (H_O) و مورد انتظار (H_E) و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص شانون (H')

نام جایگاه شاخص	N_E	H_O	H_E	PIC	H'
LCA33	۱/۱۹۸	۰/۰۰۰	۰/۱۶۵	۰/۱۵۱۸	۰/۳۰۵
LCA56	۲/۰۵۵	۱/۰۰۰	۰/۵۱۳	۰/۳۹۵۳	۰/۷۵۶
LCA63	۴/۳۴۶	۱/۰۰۰	۰/۷۷۰	۰/۷۳۰۸	۱/۵۱۷
LCA77	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰
VOLP03	۲/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۵۰۰	۰/۳۷۵	۰/۶۹۳
VOLP67	۴/۳۷۵	۱/۰۰۰	۰/۷۷۱	۰/۷۴۱۸	۱/۷۲۰
YWLL08	۳/۳۷۷	۱/۰۰۰	۰/۷۰۴	۰/۶۵۰۱	۱/۲۸۸
Mean±SD	۲/۶۲۲±۰/۵۳	۰/۷۱۴±۰/۱۸	۰/۴۸۹±۰/۱۱	۰/۵۵۷±۰/۲۴	۰/۸۹۷±۰/۲۴

منابع

Barker JSF (1999) Conservation of livestock breed diversity. *Animal Genetics Resources Information* 25:33–43.

Bruford MW, Bradley D, Luikart G (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics* 4:900–910.

Buchanan FC, Thue TD (1998) Intrabreed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep. *Canadian Journal of Animal Science* 78:425–428.

Diamond J (2002) Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418:700–707.

FAO (2007) The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome.

Hall SJG, Bradley DG (1995) Conserving livestock breed diversity. *Trends in Ecology and Evolution* 10:267–270.

Hedrick PW (1999) Genetics of populations, Second edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury MA, USA.

Hoffmann I, Marsan PA, Barker SF, Cothran EG, Hanotte O, Lenstra JA, Milan D, Weigend S, Simianer H (2004) New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: recommendations of a joint ISAG/FAO working group. In: 29th International Conference on Animal Genetics p. 123 (abstract), Meiji University, Tokyo, Japan. FAO, Rome.

Ji R, Cui P, Ding F, Geng J, Gao H, Zhang H, Yu J, Hu S, Meng H (2009) Monophyletic origin of domestic bactrian camel (*Camelus bactrianus*) and its evolutionary relationship with the extant wild camel (*Camelus bactrianus ferus*). *Animal Genetics* 40:377–382.

Jianlin H (2000) Origin, evolution and genetic diversity of old world camelus. Doctoral dissertation of Lanzhou University, Lanzhou, China.

Jianlin H (2005) Achievement of research in the field of camelids. In: WAAP Book of the Year – 2005 (Ed. by Rosati A, Tewolde A, Mosconi C), pp. 177–87. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Jianlin H, Mburu D, Ochieng J, Kaufmann B, Rege J, Hanotte O (2000) Application of new world camelidae microsatellite primers for amplification of polymorphic loci in old world camelids. *Animal Genetics* 31:404–419.

Jianlin H, Ochieng J, Lkhagva B, Hanotte O (2004) Genetic diversity and relationship of domestic bactrian camels (*Camelus bactrianus*) in China and Mongolia. *Journal of Camel Practice and Research* 12:97–99.

Lang KDM, Wang Y, Plante Y (1996) Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in llama and alpacas. *Animal Genetics* 27:285.

Lewontin, RC (1974). The genetic basis of evolutionary change. Columbia Univ. Press, New York.

Mate M, Bustamante A, Giovambattista G, de Lamo D, von Thungen J, Zambelli A, Vidal-Rioja L (2005) Genetic diversity and differentiation of guanaco populations from Argentina inferred from microsatellite data. *Animal Genetics* 36:316–321.

Mburu DN, Ochieng JW, Kuria SG, Jianlin H, Kaufmann B, Rege EO, Hanotte O (2003) Genetic diversity and relationships of indigenous Kenyan camel (*Camelus dromedarius*) populations: implications for their classification. *Animal Genetics* 34:26–32.

- Mehta SC, Goyal A, Sahani MS (2007) Microsatellite markers for genetic characterisation of Kachchhi camel. *Indian Journal of Biotechnology* 6:336-339.
- Miller S, DyKes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*, 16:12-15.
- Nevo E (1978) Genetic variation in natural population: Patterns and theory. *Theoretical Population Biology* 13:121-177.
- Nolte M, Kotzé A, van der Bank FH, Grobler JP (2005) Microsatellite markers reveal low genetic differentiation among southern African *Camelus dromedarius* populations. *South African Journal of Animal Science* 35:152-161.
- Ruane J (2000) A framework for prioritizing domestic animal breeds for conservation purposes at the national level: a Norwegian case study. *Conservation Biology* 14:1385-1393.
- Sanguinetti CJ, Neto ED, Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR product separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17:915-919.
- Simianer H (2005) Decision making in livestock conservation. *Ecological Economics* 53:559-572.
- Spencer PBS, Wilson K J, Tinson A (2010) Parentage testing of racing camels (*Camelus dromedaries*) using microsatellite DNA typing. *Animal Genetics* 41:662-665.
- Spencer PBS, Woolnough AP (2010) Assessment and genetic characterisation of Australian camels using microsatellite polymorphisms. *Livestock Science* 129:241-245.
- Stevens C (1989) *Tin Mosques and Ghantowns: A history of Afghan camel drives in Australia*. Oxford University Press, Melbourne.
- Toro M, Fernández J, Caballero A (2009) Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livestock Science* 120:174-195.
- Toro M, Caballero A (2005) Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Science* 360:1367-1378.
- Weitzman ML (1993) What to preserve? An application of diversity theory to crane conservation. *Quarterly Journal of Economy* 108:157-183.